

••• ФІЗИОЛОГІЯ РОСЛИН ••• PLANT PHYSIOLOGY •••

DOI: 10.26565/2075-5457-2023-40-4
УДК 577.175.1:581.543:633.111.1

Фітогормональний баланс в листках ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці м'якої О.О. Авксентьева

В роботі представлені результати дослідження фітогормонального балансу зрілих сформованих листків ліній пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. озимого сорту Ольвія у період переходу від вегетативної фази розвитку до генеративної. Як рослинний матеріал використовували майже ізогенні за генами потреби в яровизації *VRN* лінії (NILs), створені в генофоні сорту Ольвія, та рослини яровизованого і неяровизованого цього озимого сорту. Експерименти проводили за умов вегетаційного досліду в факторостатній камері кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В.Н. Каразіна. Протягом експерименту вели фенологічні спостереження, аналізували темпи розвитку дослідних рослин. Фітогормональний аналіз проводили у фіксованому рослинному матеріалі шляхом розподілу суміші фітогормонів методом тонкошарової хроматографії, ідентифікацію здійснювали за свідками-стандартами, опромінюючи хроматограми ультрафіолетом УФ (254 нм), вміст визначали методами біотестування. Аналізували вміст основних класів класичних рістстимулюючих фітогормонів – ауксинів (ІОК), цитокинінів (ЦК), гіберелінів (ГК) та рістінгібуючого гормону – абсцизової кислоти (АБК), також розраховували показники фігормонального балансу як співвідношення рістстимулюючих гормонів до рістінгібуючих. Результати експериментів показали, що вміст основних класів фітогормонів в зрілих сформованих листках дослідних рослин представлений ауксинами в межах 64,9-70,7 мкг/г, цитокинінами – 26,6-30,5 мкг/г, гіберелінами – 179,47-228,68 мкг/г та абсцизинами – 54,06-89,76 мкг/г сухої маси. Показано, що серед досліджених класів фітогормонів в листках мінімальним є вміст цитокинінів, максимально представлені фітогормони терпеноїдної природи – гібереліни та абсцизини. Встановлено, що фітогормональний баланс – співвідношення рістстимулюючих фітогормонів до рістінгібуючих відображає темпи розвитку дослідних рослин. Рослини, що розвиваються швидкими темпами (ізогенні лінії *VRN 1* та *VRN 3* і рослини яровизованого сорту), характеризувалися максимальними показниками фітогормонального балансу (особливо ГК/АБК), рослини з повільними темпами розвитку (ізолінія *VRN 2* та рослини неяровизованого сорту Ольвія) – мінімальними. Оскільки рослинний організм представляє собою єдину систему взаємопов'язаних органів та функцій, припускаємо, що даний показник – фітогормональний баланс – в листках рослин можна використовувати в якості маркера онтогенетичного стану цілісного рослинного організму. Виявлені зміни фітогормонального статусу зрілих сформованих листків та темпи розвитку дослідних рослин мають однакові закономірності на різних моделях, що використовувались в наших дослідженнях – моделі ізогенних ліній і моделі яровизованих та неяровизованих рослин озимого сорту. Цей факт дає можливість припустити, що зміни фітогормонального балансу зрілих листків, які відображають онтогенетичний стан цілісного рослинного організму, обумовлені генотиповим та фенотиповим (епігенетичним) впливом.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., гени *VRN*, яровизація, фітогормональний баланс, ІОК, ЦК, ГК, АБК, темпи розвитку.

Цитування: Авксентьева О.О. Фітогормональний баланс в листках ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці м'якої. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 2023, 40, 49–58. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-40-4>

Про автора:

О.О. Авксентьева – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи 4, Харків, Україна, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

Подано до редакції: 26.07.2022 / Прорецензовано: 05.10.2022 / Прийнято до друку: 24.05.2023

Вступ

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) є поширеною зерновою культурою, яка вирощується в усьому світі за дуже різноманітних екологічних умов, до яких вона адаптована завдяки складному геному та природному різноманіттю. Регуляція переходу від вегетативної фази розвитку до генеративної, тобто перехід до колосіння, є провідною агрономічною ознакою, яка впливає на адаптивність різних сортів пшениці м'якої (Shi et al., 2019). Відомо, що тривалість періоду сході-

колосіння (ПСК), яка визначає час цвітіння та в свою чергу впливає на урожайність сортів пшениці, детермінується низкою екзогенних та ендогенних факторів. Серед найважливіших екологічних факторів, які впливають на перехід рослин до колосіння, є яровизація, фотоперіод, екзогенні фітогормони (дія гіберелінів), стресові фактори (Chen et al., 2018). Серед ендогенних факторів – ознака скоростиглості *per se* (*Eps*) та ендогенні фітогормони – фітогормональний баланс. Потреба в яровизації (верналізації) контролюється у *Triticum aestivum* L. системою генів *VRN*, яка визначає тип розвитку рослин – озимий (всі гени представлені рецесивними алелями) або ярий (хоча б один з генів *VRN* у генотипі є домінантним (Yan et al., 2004; Nadolska-Orczyk et al., 2017; Li et al., 2018).

Фітогормональна система рослинного організму, де фітогормони виступають як первинні месенджери, є провідною в регуляції процесів росту та розвитку рослин. Відповідно до сучасної концепції фітогормонології, регуляторну функцію в рослинному організмі здійснює не окремий фітогормон, а саме фітогормональний баланс – співвідношення основних фітогормонів в певний онтогенетичний період розвитку рослинного організму (Gaspar et al., 2003). Регуляція переходу рослин пшениці м'якої до колосіння може здійснюватися різноманітними шляхами (регуляторними сітками), де обов'язковою складовою є фітогормональний контроль (Nadolska-Orczyk et al., 2017). Відомо, що екзогенні гібереліни (ГК) можуть стимулювати цей процес у сортів пшениці з різною потребою в яровизації та фотоперіоді (Pearce et al., 2013; Skalicky et al., 2020). Останніми роками з'являються роботи, де встановлено, що ендогенні фітогормони ізопреноїдної природи – гібереліни, абсцизова кислота, брасиностероїди, які мають спільні метаболічні шляхи, також відіграють важливу роль в регуляції тривалості переходу до цвітіння (Gawagecka, Ahn, 2021). Показано, що синтез, накопичення цукрів і цукровий сигналінг та інші метаболіти також можуть впливати на цей процес (Gawagecka, Ahn, 2021). Листя – головний асиміляційний орган рослинного організму (Wu et al., 2021), де саме відбуваються процес біосинтезу цукрів та їх транспорт до атрагуючих центрів рослини, якими за переходу до колосіння у пшениці є колосся, що формуються. Ми припустили, що фітогормональний баланс в зрілому, сформованому листку може певною мірою відобразити онтогенетичний стан цілісного рослинного організму.

Отже метою даної роботи було провести дослідження фітогормонального балансу в листках ізогенних ліній пшениці, що різняться за станом генів контролю потреби в яровизації, і яровизованих та неяровизованих рослин озимого сорту пшениці в залежності від темпів розвитку дослідних рослин для виявлення маркерів онтогенетичного стану.

Матеріали та методи

Як рослинний матеріал в роботі використовували лінії пшениці м'якої сорту Ольвія, що різняться за типом розвитку. Експерименти проводили з 4-ма генотипами: моногеннодомінантними за генами *VRN* (потреби в яровизації) лініями, створеними у генфоні сорту Ольвія з ярим типом розвитку та озимим сортом Ольвія. Досліди проводили в умовах вегетаційного експерименту у факторостатній камері кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Попередньо простерилізоване насіння озимого сорту Ольвія яровизували в чашках Петрі у холодильній камері за температури $+4\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 45 діб. Потім одночасно яровизоване та неяровизоване насіння озимого сорту Ольвія та ізогенних ліній (NILs) за генами *VRN* висівали у вегетаційні посудини об'ємом 2 л та культивували у ґрунтовій культурі. Умови культивування – ґрунт чорнозем з додаванням комплексного мінерального добрива (тричі протягом експерименту), освітленість 15–20 клк, температура $22\pm 2/18\pm 2^\circ\text{C}$ (день/ніч), фотоперіод 16/8 годин (день/ніч) та вологість повітря 70%.

Протягом експерименту проводили фенологічні спостереження, відзначаючи наступні фенофази розвитку пшениці – фаза кушіння, виходу у трубку та колосіння. Фазу вважали такою, що наступила, якщо більш 50% рослин перешли до цієї фенофази. У фенофазу трубкування проводили фіксацію другого зверху повністю сформованого листка для подальшого визначення вмісту основних класів фітогормонів.

Фітогормони екстрагували з фіксованого рослинного матеріалу 80% етанолом, потім проводили концентрування до водного залишку, очищення виморожуванням та центрифугуванням. Аліквоту водного залишку екстрагували для виявлення вільних форм ІОК, АБК, гіберелінів етилацетатом (рН 3), для виявлення цитокінінів – *n*-бутанолом (рН 8). Потім знову проводили концентрування шляхом випаровування до сухого залишку, осад розчиняли в етанолі та проводили хроматографічний розподіл суміші гормонів методом тонкошарової хроматографії, використовуючи

силікагелеві пластинки (Silicagel 60 UV254) із алюмінієвою підложкою фірми «Merck Chemicals» (Німеччина) (Shcherbatiuk et al., 2020). Фітогормони на хроматограмах ідентифікували за свідками-стандартами при УФ світлі $\lambda=254$ нм. Ідентифіковані ФГ елюювали 80% етанолом та проводили визначення вмісту методами біотестування: ауксини – індолілоцтова кислота (ІОК) – за приростом колеоптелів пшениці, цитокініни (ЦК) – за визначенням вмісту амарантину у сім'ядолях щиріці (*Amarantus caudatus* L.), гібереліни (ГК) – методом «половинок» насіння карликового сорту гороху, абсцизову кислоту (АБК) – за інгібуванням проростання насіння гірчиці (Avksentieva et al., 2018). Вміст фітогормонів розраховували за рістконцентраційними кривими, які були побудовані з використанням стандартів: ІОК (Синбіас, Китай-Україна), зеатин транс-ізомер (Duchefa Biochemie, Нідерланди), гіберелова кислота GA₃ (Sigma-Aldrich, США) та АБК (Sigma-Aldrich, США).

Проведено три біологічні серії експериментів з трикратною аналітичною повторністю. Отримані результати проаналізовані статистично методом однофакторного дисперсійного аналізу (Atramentova, Utevskaaya, 2008) за використання Excel 2010. В таблицях наведені середні значення та їх стандартні похибки.

Результати

Дослідження тривалості фенологічних фаз розвитку на моделі ізогенних ліній пшениці сорту Ольвія відображає роль окремих генів системи *VRN* в регуляції процесу переходу до колосіння у пшениці м'якої. За результатами наших спостережень культивування рослин в модельних умовах факторостатної камери (табл. 1) встановлено, що досліджувані лінії різняться за швидкістю проходження фенофаз та переходом від вегетативного етапу розвитку до генеративного.

Таблиця 1. Тривалість фенофаз в онтогенезі ізоліній пшениці сорту Ольвія, що різняться за типом розвитку (діб від сходів)

Table 1. The duration of phenological development stages in the ontogeny of wheat isolines Olvia variety, which differ by type of development (days from germination)

Лінія	Генотип	Тип розвитку	Тривалість фенофаз, діб від сходів		
			кущіння	трубкування	колосіння
VRN 1	<i>VRN A1aB1bD1b</i>	ярий	21±2	66±3	85±3
VRN 2	<i>VRN A1bB1aD1b</i>	ярий	21±2	88±4	95±2
VRN 3	<i>VRN A1bB1bD1a</i>	ярий	21±2	75±3	90±4
сорт яр.	<i>vrn a1bb1bd1b</i>	озимий (яровизований)	18±1	105±4	112±5
сорт н/яр.	<i>vrn a1bb1bd1b</i>	озимий (неяровизований)	20±1	-	-
<i>HCP_{0.5}</i>			2	5	7

Перехід до фенофази кущіння відбувається одночасно у всіх досліджуваних ізоліній та неістотно швидше у рослин сорту, як яровизованих, так і неяровизованих, генотип яких представлений генами *vrn* тільки у рецесивному стані. Перехід до стадії трубкування, який вже відображає перехід до генеративного етапу розвитку рослин м'якої пшениці, виявляє істотну різницю у термінах між досліджуваними ізолініями. Найшвидше трубкування настає у рослин ізолінії *VRN 1* – на 66 добу культивування, потім – у ізолінії *VRN 3* на 75 добу, повільніше – у ізолінії *VRN 2* на 88 добу і найдовше цей перехід відбувається у рослин сорту, насіння яких пройшло штучну яровизацію – на 105 добу. Проростки озимого сорту Ольвія, що не яровизували, протягом експерименту перебувають у стадії кущіння і взагалі не переходять до генеративного розвитку, тобто не проходять фенофази трубкування та колосіння. Терміни проходження фенофази колосіння також різняться у рослин NILs та сорту. За швидкістю переходу до цієї фенофази досліджувані лінії розподіляються таким же чином, як і до фенофази трубкування *VRN1* < *VRN3* < *VRN 2* < сорт яровизований. Перехід до стадії колосіння настає на 85–112 добу. Мінімально швидкі темпи у ізолінії *VRN 1* – 85 діб, максимально довгі у рослин яровизованого озимого сорту – 112 діб. Отже серед досліджуваних ліній можна виділити групи ізоліній, що розвиваються швидкими темпами, – лінії *VRN 1* та *VRN 3* та лінії, що розвиваються повільними темпами, – лінія *VRN 2* та рослини яровизованого озимого сорту Ольвія.

Результати дослідження вмісту головного рістстимулюючого фітогормону – індолілоцтової кислоти (ІОК) в сформованих зрілих листках рослин показали відмінності між досліджуваними ізолініями та рослинами яровизованого та неяровизованого сорту Ольвія (рис. 1А).

Вміст ІОК в листках коливався в межах 64,9–70,7 мкг/г сухої маси. Максимальна концентрація фітогормону виявлена в листках ізолінії *VRN 1*, яка за темпами розвитку випереджає всі інші дослідні лінії та максимально швидко переходить до генеративного етапу розвитку. Мінімальний вміст – 64,9 мкг/г у ізолінії *VRN 2*, яка характеризується повільними темпами розвитку. Рослини озимого сорту яровизовані та неяровизовані також відрізняються за вмістом ІОК в листках – у неяровизованих рослин вміст ауксинів нижчий, ніж у яровизованих. Отже, виявлена тенденція в розподілі між досліджуваними лініями за концентрацією ІОК – ізолінії з повільними темпами розвитку та неяровизовані рослини озимого сорту містять в сформованих листках менше ІОК, ніж ізолінії з швидкими темпами росту та яровизовані рослини озимого сорту Ольвія.

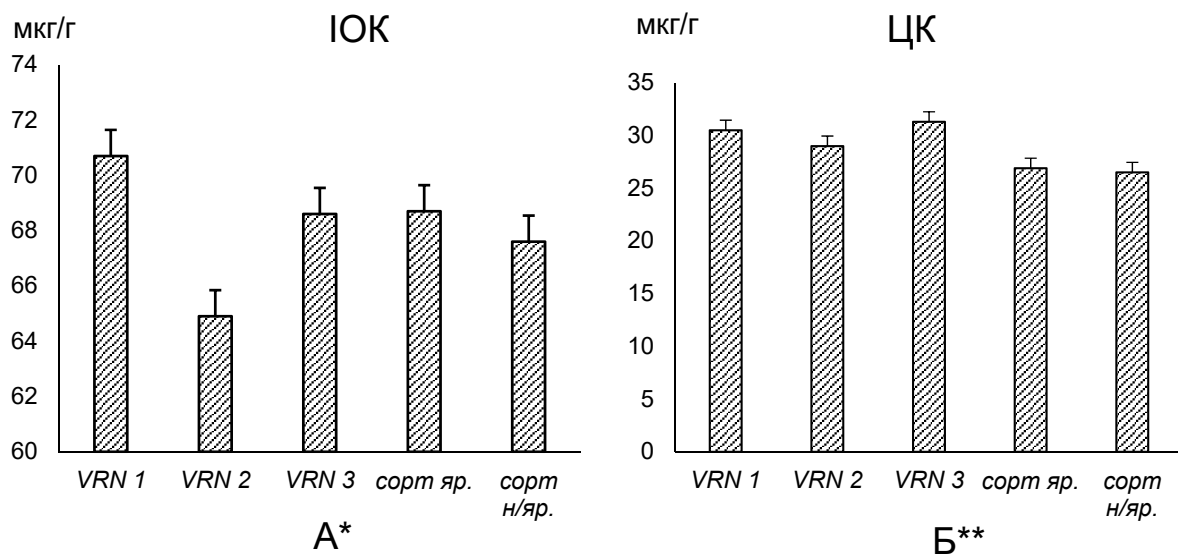


Рис. 1. Вміст ауксинів ІОК (А*) та цитокинінів ЦК (Б**) в листках майже ізогенних ліній (NILs) за генами *VRN* пшениці сорту Ольвія, мкг/г сухої маси (примітки: * $HCP_{0,5} 3,04$; ** $HCP_{0,5} 1,07$)
Fig. 1. The content of auxins IAA (A*) and cytokinins CK (B**) in the leaves in NILs of *VRN* genes of Olvia wheat variety, µg/g of dry weight (notes: * $LSD_{0.5} 3.04$; ** $LSD_{0.5} 1, 07$)

Результати аналізу вмісту цитокинінів – фітогормонів, які стимулюють процеси росту та особливо проліферації в рослинному організмі, показали, що в зрілих сформованих листках рослин пшениці м'якої концентрація гормонів цього класу найнижча в порівнянні з іншими досліджуваними класами фітогормонів – ауксинами, гіберелінами та абсцизінами (рис. 1Б). Фітогормони всіх класів присутні у всіх органах, тканинах та клітинах рослинного організму, але в різному співвідношенні в різні періоди онтогенезу. Основним місцем біосинтезу ЦК в рослинному організмі, як відомо, є корені, можливо, цим пояснюється менша концентрація цих фітогормонів в листках м'якої пшениці. Вміст ЦК в сформованих листках досліджуваних ліній сорту Ольвія в період переходу від вегетативної стадії розвитку до генеративної в наших дослідках становить 26,5–31,3 мкг/г сухої маси. Максимальний вміст виявлений у NILs – 29,5–31,3 мкг/г, менший – у рослин яровизованого та неяровизованого сорту Ольвія – 26,5–26,9 мкг/г. Серед ізоліній спостерігаємо таку закономірність – максимальний вміст ЦК в листках ізоліній з більш швидкими темпами розвитку *VRN 1* та *VRN 3*, мінімальний – у ізолінії з повільними темпами *VRN 2*. Таку ж тенденцію було встановлено і щодо вмісту іншого класу рістстимулюючих фітогормонів – ауксинів.

Аналіз вмісту гіберелінів виявив максимальний їх вміст в листках експериментальних рослин в порівнянні з іншими досліджуваними класами фітогормонів (рис. 2А). Вміст гіберелінів на порядок перевищує вміст всіх інших класів фітогормонів – ауксинів, ЦК, АБК. Головним місцем біосинтезу гормонів цього класу є саме листя, можливо, цим пояснюється така висока концентрація цих

фітогормонів саме в головних фотосинтезуючих органах рослин. Концентрація ГК в листках досліджуваних ліній варіює в межах 179,47–228,69 мкг/г сухої маси. Розподіл за вмістом цих фітогормонів серед ізоляцій залежить від темпів розвитку цих рослин та швидкості їхнього переходу від вегетативного до генеративного етапу розвитку.

Результати дослідження вмісту рістінгібуючого фітогормону – АБК в листках ізогенних за генами *VRN* ліній пшениці показали протилежну картину по відношенню до вмісту основних рістстимулюючих фітогормонів (рис. 2Б). Максимальний вміст АБК – 89,76 мкг/г сухої маси виявлений в листках рослин неяровизованого сорту Ольвія, які протягом експерименту перебувають у вегетативній фазі розвитку (фенофазі кушіння) та не переходять до генеративного етапу. В листках рослин яровизованого сорту Ольвія вміст АБК значно менший і становить 73,27 мкг/г сухої маси.

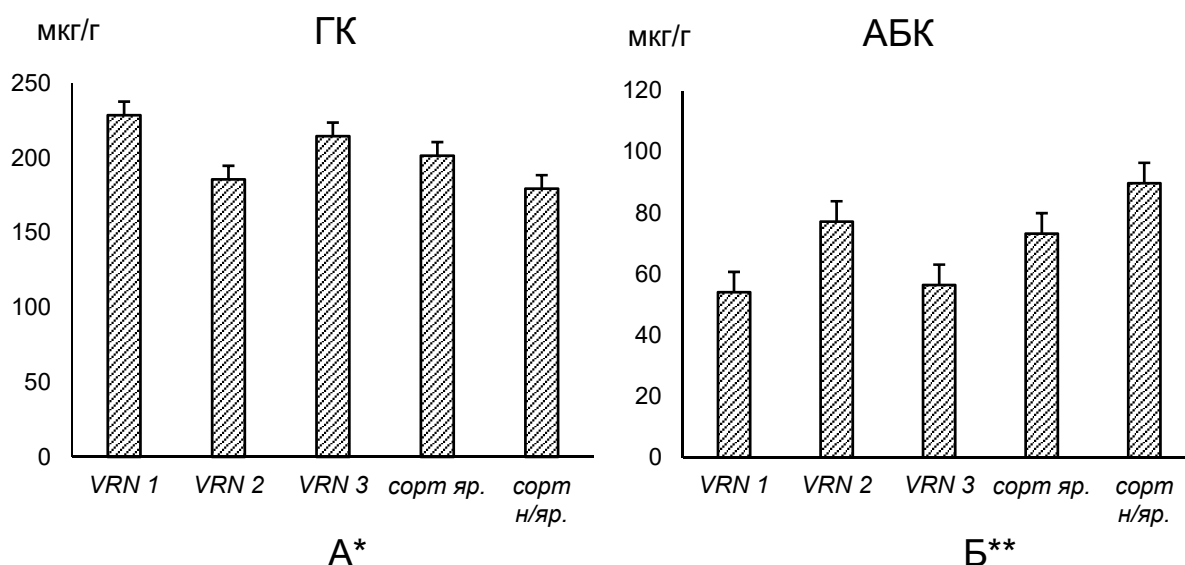


Рис. 2. Вміст гіберелінів ГК (A*) та абсцизінів АБК (B) в листках NILs за генами *VRN* пшениці сорту Ольвія, мкг/г сухої маси (примітки: * $HCP_{0.5} 12,17$; ** $HCP_{0.5} 7,23$)**

Fig. 2. The content of gibberellins GA (A*) and abscisins ABA (B) in the leaves in NILs of *VRN* genes of wheat variety Olvia, µg/g of dry weight (notes: * $LSD_{0.5} 12,17$; ** $LSD_{0.5} 7,23$)**

Серед ізоляцій NILs максимальний вміст 77,18 мкг/г виявлено в листках ізоляції *VRN 2* з повільними темпами розвитку. Ізоляції, що характеризуються швидкими темпами розвитку, *VRN 1* та *VRN 3* мають мінімальний вміст АБК 54,06 мкг/г та 56,44 мкг/г відповідно та між собою за концентрацією фітогормону майже не різняться.

Отже, і серед рослин сорту Ольвія яровизованого та неяровизованого та серед ізоляцій NILs за генами контролю потреби в яровизації спостерігається подібна закономірність: рослини з повільними темпами розвитку мають більшу концентрацію фітогормону АБК, ніж рослини, що швидше переходять до генеративного етапу розвитку.

Обговорення

Індол-3-оцтова кислота (ІОК) – основний ауксин вищих рослин, який максимально впливає на ріст та розвиток рослин. Динамічний диференційований розподіл гормону ауксину в тканинах рослин контролює різноманітність процесів розвитку, які адаптують процеси росту та морфогенезу рослин до умов навколишнього середовища (Vanneste, Friml, 2009). Різні екологічні та ендогенні сигнали можуть бути інтегровані в зміни у розподілі ауксину завдяки їх впливу на локальний біосинтез та /або міжклітинний і міжорганний транспорт фітогормону ауксину по рослинному організму. У біології рослин досить тривалий час панувала догма про те, що полярна транспортна система ауксину необхідна і достатня для генерації максимуму і мінімуму ауксину, які необхідні майже для всіх аспектів росту і розвитку рослин (Zhao, 2010). Однак останні кілька років стало зрозуміло, що

локальний біосинтез ауксину також може підтримувати регуляцію процесів росту рослин у відповідь на сигнали навколишнього середовища, включаючи світло, температуру, патогени та інші (Zhao, 2018). Отже певний вміст ауксинів в листках досліджуваних рослин може бути результатом локального біосинтезу гормону саме в цих фотосинтезуючих органах або обумовлений полярним, як правило, далеким ксилемним транспортом, що в свою чергу пов'язаний із системою донорно-акцепторних взаємовідносин рослинного організму.

Аналіз вмісту ІОК в листках ізогенних ліній і рослин сорту Ольвія та темпів розвитку досліджуваних рослин виявив взаємозв'язок цих показників. Ізолінії, що розвиваються швидкими темпами, та яровизовані рослини сорту мають підвищений вміст головного рістстимулюючого фітогормону – ауксину по відношенню до ізолінії з повільними темпами розвитку та неяровизованих рослин. Можна припустити, що підвищений вміст фітогормону характеризує не тільки онтогенетичний стан основного фотосинтезуючого органу листка, як функціонально активного, але й може виступати в якості маркеру, що відображає загальний стан розвитку рослинного організму.

Цитокініни є одним із найважливіших компонентів фітогормонального комплексу рослин. Вони беруть участь у регуляції всіх життєвих функцій рослинного організму, зокрема клітинного поділу, утворення меристем, контролі процесів формування, спокою та проростання насіння, регуляції процесів фотосинтезу опосередковано через хлорофілогенез, старіння організму, формуванні антистресових реакцій та ін. (Vedenicheva, Kosakivska, 2020). Цитокініни, за біохімічною природою, є N-6-заміщені похідні аденіну. Метаболічно вміст та активність цитокінінів контролюються за допомогою процесів біосинтезу ізопентенілтрансферазою (IPT), катаболізму цитокінінооксидазою/дегідрогеназою (ЦКО) та інактивації за допомогою глюкозилування цитокінінглукосилтрансферазами (ЦГТ) (Chen et al., 2021). Рослинні гормони цитокініни нерівномірно розподілені всередині клітинних компартментів та у зовнішній частині клітин листка (Jiskrova et al., 2016). Однодольні та дводольні рослини демонструють значні відмінності у складі метаболітів цитокінінів (Vedenicheva, Kosakivska, 2020; Jiskrova et al., 2016).

За нашими результатами, вміст фітогормонів цього класу – цитокінінів у зрілих сформованих листках є мінімальним по відношенню до інших класів досліджуваних фітогормонів. Оскільки в наших дослідженнях ми аналізували вміст фітогормонів цитокінінів за вмістом свідка – транс-ізомеру зеатину – основної фізіологічно активної форми цитокінінів, то вміст інших форм – цис-форм та глюкозидів – зеатин-рибозиду та зеатин-глюкозиду (фізіологічно менш активних або неактивних) в наших дослідках не був врахованим. Цитокініни, як відомо, є головними регуляторами процесів старіння листків за рахунок стимуляції процесів біосинтезу хлорофілу. Їх вміст може значно підвищуватися як фактор запобігання старінню асимілюючих органів рослини. Невисокий вміст гормонів цього класу у всіх досліджуваних рослин може свідчити про стабільну фізіологічну активність зрілих сформованих листків в даний онтогенетичний період, коли проводилися аналізи. В той же час аналіз вмісту фітогормонів у ізолінії з різними темпами розвитку показав аналогічну тенденцію змін за вмістом головного рістстимулюючого фітогормону – ауксину. Ізолінія з повільними темпами розвитку має менший вміст ЦК по відношенню до ізолінії з швидкими темпами розвитку. Вміст ЦК в листках рослин сорту яровизованих та неяровизованих є істотно нижчим, ніж в листках ізогенних ліній, що, можливо, обумовлено саме генотиповими відмінностями.

Гібереліни являють собою важливу групу дитерпенових гормонів рослин, які контролюють різні аспекти росту та розвитку рослин від проростання та формування насіння до цвітіння. Серед відомих класів фітогормонів саме гібереліни (гіберелова кислота) виконують основну роль в процесах індукції флорального морфогенезу рослин, а також регуляції процесу яровизації (верналізації) у дводольних рослин та злаків (Shang et al., 2017). Гібереліни забезпечують один з чотирьох ідентифікованих на сьогоднішній шляхів ініціації цвітіння через активацію синтезу та транспорту флоригену – білок FT – так званий «гібереліновий шлях індукції». Крім того, обробка дводольних рослин та деяких злаків, зокрема пшениці м'якої, екзогенним ГК₃ збільшує кількість рослин, здатних досягти порога індукційно-генеративного розвитку, може замінити потребу в довгому дні та сприяти переходу до цвітіння, тобто генеративного розвитку (Skalicky et al., 2020). В наших дослідженнях встановлено, що в листках рослин пшениці в досліджуваній онтогенетичний період вміст фітогормонів цього класу є максимальним по відношенню до інших рістстимулюючих та рістінгібуючих фітогормонів. Як відомо, зрілі листки рослин є основним органом біосинтезу ГК, що може відбуватися двома шляхами – цитозольним та хлоропластним. Наявність максимального вмісту гормонів цього класу також опосередковано може свідчити про фізіологічно активний стан листків експериментальних рослин в

досліджуваний онтогенетичний період. Клас гіберелінів представлений широким спектром форм, але максимальну активність по відношенню саме до реалізації «гіберелінового шляху ініціації цвітіння» проявляє гіберелова кислота ГК₃, яка також може бути і транспортною формою та пасивно переміщатись по рослині разом з ксилемним та флоемним потоками. Аналіз зіставлення вмісту ГК₃ в листках дослідних рослин пшениці сорту Ольвія та їхніх темпів розвитку знову ж таки демонструє тенденцію, характерну і для інших класів рістстимулюючих фітогормонів – ауксинів та цитокінінів. Дослідні рослини з швидкими темпами розвитку характеризуються максимальними показниками вмісту ГК, по відношенню до рослин, що розвиваються повільніше. Така закономірність проявляється і на моделі ізогенних ліній, тобто рослин, що генотипово різняться між собою за станом окремих локусів генів *VRN*, і на моделі рослин яровизованого та неяровизованого сорту – тобто дослідних рослин з повністю однаковим генотипом, але які різняться між собою за епігенетичного (яровизаційного) впливу.

Абсцизова кислота, на відміну від інших досліджуваних класів фітогормонів, є рістінгібуючим фітогормоном, тобто антагоністом по відношенню до рістрегулюючої дії ІОК, ЦК та ГК. Абсцизова кислота є добре відомим та достатньо дослідженим фітогормоном, який бере участь у контролі процесів росту та розвитку рослин, а також реакції на абіотичний та, за останніми дослідженнями, і біотичний стрес (Finkelstein, 2013). Досить добре вивченими є механізми регуляції АБК стрес-відповіді рослин, зокрема пшениці м'якої, на посуху, екстремальні температури, засолення, дії патогенів тощо (Gietler et al., 2020; Luo et al., 2021). Менша увага дослідників зосереджена на вивченні ролі АБК у регуляції темпів розвитку рослин, більш детально в цьому аспекті досліджено процеси спокою та проростання насіння за фітогормонального впливу АБК (Kosakivska et al., 2019). За біохімічною природою АБК, також як і ГК, є терпеноїдом, та також основним органом біосинтезу АБК в рослинному організмі є листя. За нашими даними вміст АБК в зрілих сформованих листках у дослідних рослин є достатньо високим. Розподіл за вмістом цього фітогормону серед NILs та рослин яровизованого та неяровизованого сорту є протилежним по відношенню до вмісту всіх класів рістстимулюючих фітогормонів. Ізолінія, що проявляє повільні темпи розвитку, характеризується максимальним вмістом АБК, лінії з швидкими темпами – навпаки, мінімальним вмістом. В листках рослин неяровизованого сорту, які протягом експерименту перебувають на вегетативній фазі розвитку, вміст АБК є більшим, ніж в листках яровизованих рослин, які здатні переходити до колосіння, тобто генеративного розвитку.

Вміст окремого класу фітогормону в певному органі рослини в той чи інший онтогенетичний період розвитку не є інформативним з точки зору регуляції процесів розвитку. Вважається, що найважливішим показником є фітогормональний баланс, тобто співвідношення певних класів ФГ (антагоністів чи синергістів) між собою. Саме зміни у фітогормональному статусі відображають регуляторні впливи фітогормонів на реакції-відповіді рослинного організму за дії екзогенних або ендогенних факторів (Patyka et al., 2019; Gaspar et al, 2003).

В наших дослідженнях ми розраховували фітогормональний баланс в листках дослідних рослин як відношення вмісту рістстимулюючих фітогормонів ІОК, ЦК та ГК до вмісту рістінгібуючого гормону АБК (табл. 2).

Таблиця 2. Співвідношення рістстимулюючих та рістінгібуючих фітогормонів в листках NILs за генами *VRN* пшениці сорту Ольвія, що різняться за типом розвитку
Table 2. The ratio of growth-stimulating and growth-inhibiting phytohormones in the leaves in NILs of *VRN* genes of wheat variety Olvia, which differ by type of development

Лінія	Генотип	Тип розвитку	Співвідношення ФГ			
			ІОК/ АБК	ЦК/ АБК	ГК/ АБК	ІОК+ЦК+Г К/ АБК
<i>VRN 1</i>	<i>VRN A1aB1bD1b</i>	ярий	1,30	0,56	4,23	6,19
<i>VRN 2</i>	<i>VRN A1bB1aD1b</i>	ярий	0,84	0,38	2,41	3,62
<i>VRN 3</i>	<i>VRN A1bB1bD1a</i>	ярий	1,23	0,55	3,81	5,57
<i>сорт яр.</i>	<i>Vrn a1bb1bd1b</i>	озимий (яр.)	0,93	0,37	2,75	5,50
<i>сорт н/яр.</i>	<i>Vrn a1bb1bd1b</i>	озимий (неяр.)	0,75	0,30	2,00	3,04
		<i>HCP_{0,5}</i>	0,12	0,07	0,57	1,75

Фітогормональний баланс в листках ізогенних ліній в період переходу дослідних рослин до генеративного розвитку, як при розрахунку окремих фітогормонів, так і при розрахунку суми всіх рістстимулюючих гормонів демонструє однакову тенденцію. В листках ізолінії *VRN 2* з повільними темпами розвитку виявлено мінімальні показники, у лінії зі швидкими темпами розвитку *VRN 1* та *VRN 3* – в середньому для всіх досліджених співвідношень майже в півтори рази більше.

Отже, рослини, що переходять до генеративного розвитку, характеризуються підвищеними показниками відношення вмісту рістстимулюючих фітогормонів до рістінгібуючих в листках, найбільш контрастні відмінності виявлені для співвідношення ГК/АБК – головних фітогормонів зрілого сформованого листа. Така ж тенденція спостерігається на моделі яровизованих та неяровизованих рослин озимого сорту Ольвія (табл. 2).

Показники фітогормонального балансу використовують для характеристики різноманітних процесів розвитку рослинного організму або реакції-відповіді на дію ендогенних чи екзогенних факторів. Так, співвідношення ГК/АБК є поширеним маркером, який використовують при дослідженні процесів спокою та проростання насіння однодольних та дводольних рослин (Kosakivska et al., 2019). Показано, що за ініціації виходу зі стану спокою та активації проростання насіння рису (*Oryza sativa* L.) показник ГК/АБК завжди збільшується (Yang et al., 2022). Також цей маркер використовують для характеристики процесів бульбоутворення у багатьох культур – *Solanum tuberosum*, *Nelumbo nucifera*, *Ipomoea batatas*, *Manihot esculenta* та ін. Більш високе співвідношення АБК/ГА призводить до бульбоутворення, у той час як більш високе співвідношення ГК/АБК призводить до розвитку довгих стебел та затримки процесу бульбоутворення (Chen et al., 2022). Співвідношення ІОК/АБК, як головних рістрегулюючих фітогормонів антагоністів, часто використовують для характеристики стану рослинного організму (або реакції-відповіді) на дію абіотичних та біотичних стресів. Так у роботі Патики зі співавторами при дослідженні дії біологічно активних речовин у формуванні стресостійкості м'якої пшениці до мікоплазми показник ІОК/АБК значно зростає за умов штучного зараження та зменшується за дії БАР на основі препаратів мікроелементів, отриманих за допомогою нанотехнологій (Patyka et al., 2019).

Отже, показники фітогормонального статусу рослин є комплексною ознакою, що характеризують різноманітні процеси рослинного організму в різних органах рослин або в певні онтогенетичні періоди розвитку. В наших дослідженнях виявлені зміни в фітогормональному балансі зрілих сформованих листків в залежності від темпів розвитку можна використовувати як маркер переходу до генеративного розвитку рослин пшениці м'якої.

Заключення

Таким чином, аналіз результатів, отриманих в наших дослідженнях, дозволяє констатувати, що фітогормональний статус зрілих сформованих листків пшениці м'якої в онтогенетичний період переходу до генеративного розвитку представлений рістстимулюючими фітогормонами – ауксинами, цитокінінами, гіберелінами та рістінгібуючим фітогормоном – абсцизовою кислотою. Серед досліджених класів фітогормонів в листках мінімальним є вміст цитокінінів, максимально представлені фітогормони терпеноїдної природи – гібереліни та абсцизини.

Встановлено, що фітогормональний баланс – співвідношення рістстимулюючих фітогормонів до рістінгібуючих – відображає темпи розвитку дослідних рослин. Рослини, що розвиваються швидкими темпами, характеризуються максимальними показниками фітогормонального балансу, рослини з повільними темпами розвитку – мінімальними. Виявлені зміни фітогормонального статусу зрілих сформованих листків та темпи розвитку дослідних рослин мають однакові закономірності на різних моделях, що використовувались в наших дослідженнях – ізогенних лініях і яровизованих та неяровизованих рослинах озимого сорту. Цей факт дає можливість припустити, що зміни фітогормонального балансу листків, які відображають онтогенетичний стан рослинного організму пшениці м'якої, обумовлені генотиповим та фенотиповим впливом. Оскільки у рослинному організмі існує система взаємопов'язаних органів та функцій, співвідношення вмісту рістстимулюючих фітогормонів до рістінгібуючих в листках рослин може слугувати маркером онтогенетичного стану цілого рослинного організму.

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Дослідження молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного і фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин in vivo та in vitro» № держреєстрації 0118U 002104.

Список літератури / References

- Atramentova L.A., Utevskaia O.M. (2008). *Statistical methods in biology: textbook*. Gorlovka: Likhtar, 248 p. (in Russian)
- Avksentieva O.O., Zhmurko V.V., Shchokoliev A.S., Yukhno Yu.Yu. (2018). *Physiology and biochemistry of plants*. Kh.: KhNU imeni V.N. Karazina, 156 p. (in Ukrainian)
- Chen L, Zhao J, Song J, Jameson PE. (2021). Cytokinin glucosyl transferases, key regulators of cytokinin homeostasis, have potential value for wheat improvement. *Plant Biotechnology J.*, 19(5), 878–896. <https://doi.org/10.1111/pbi.13595>
- Chen S., Wang J., Deng G. et al. (2018). Interactive effects of multiple vernalization (Vrn-1) – and photoperiod (Ppd-1)-related genes on the growth habit of bread wheat and their association with heading and flowering time. *BMC Plant Biol.*, 18, 374. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1587-8>
- Chen P., Yan, R., Bartels D. et al. (2022). Roles of abscisic acid and gibberellins in stem/root tuber development. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(9), 4955. <https://doi.org/10.3390/ijms23094955>
- Finkelstein R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, 11, 11:e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Gaspar T., Kevers C., Faivre-Rampant O. et al. (2003). Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 39, 85–106. <https://doi.org/10.1079/IVP2002393>
- Gawarecka K., Ahn J.H. (2021). Isoprenoid-derived metabolites and sugars in the regulation of flowering time: does day length matter? *Front. Plant Sci.*, 12, 765995. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.765995>
- Gietler M, Fidler J, Labudda M, Nykiel M. (2020). Abscisic acid - enemy or savior in the response of cereals to abiotic and biotic stresses? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4607. <https://doi.org/10.3390/ijms21134607>
- Jiskrova E., Novak O., Pospisilova H. et al. (2016). Extra- and intracellular distribution of cytokinins in the leaves of monocots and dicots. *New Biotechnology*, 33(5), 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.12.010>
- Kosakivska I.V., Voytenko L.V., Vasyuk V.A. et al. (2019). Phytohormonal regulation of seed germination. *Fiziol. rast. genet.*, 51 (3), 187–206. <https://doi.org/10.15407/frg2019.03.187> (in Ukrainian)
- Li Q., Byrns B., Badawi M. A. et al. (2018). Transcriptomic insights into phenological development and cold tolerance of wheat grown in the field. *Plant Physiology*, 176(3), 2376–2394. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01311>
- Luo Y., Li W., Huang C. et al. (2021). Exogenous abscisic acid coordinating leaf senescence and transport of assimilates into wheat grains under drought stress by regulating hormones homeostasis. *The Crop Journal*, 9(4), 901–914. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.08.012>
- Nadolska-Orczyk A., Rajchel I.K., Orczyk W., Gasparis S. (2017). Major genes determining yield-related traits in wheat and barley. *Theor Appl Genet.*, 130, 1081–1098. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2880-x>
- Patyka V.P., Huliaieva H.B., Bohdan M.M. et al. (2019). Phytohormone ratio and photosynthetic activity of bread wheat plants under the effect of bioactive substances. *Fiziol. rast. genet.*, 51(2), 133–146. <https://doi.org/10.15407/frg2019.02.133> (in Ukrainian)
- Pearce S., Vanzetti L.S., Dubcovsky J. (2013). Exogenous gibberellins induce wheat spike development under short days only in the presence of VERNALIZATION1. *Plant Physiology*, 163(3), 1433–1445. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225854>
- Shang M., Wang X., Zhang J. et al. (2017). Genetic regulation of GA metabolism during vernalization, floral bud initiation and development in pak choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* Makino). *Front. Plant Sci.*, 8, 1533. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01533>
- Shcherbatiuk M.M., Voitenko L.V., Vasiuk V.A., Kosakivska I.V. (2020). Method of quantitative determination of phytohormones in plant tissues. *Biol. Stud.*, 14(2), 117–136. <https://doi.org/10.30970/sbi.1402.624> (in Ukrainian)
- Shi C., Zhao L., Zhang X. et al. (2019). Gene regulatory network and abundant genetic variation play critical roles in heading stage of polyploidy wheat. *BMC Plant Biol.*, 19, 6. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1591-z>
- Skalicky M., Kubes J., Vachova P. et al. (2020). Effect of gibberellic acid on growing-point development of non-vernalized wheat plants under long-day conditions. *Plants*, 9(12), 1735. <https://doi.org/10.3390/plants9121735>
- Vanneste S., Friml J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>
- Vedenicheva N.P., Kosakivska I.V. (2020). Cytokinins in cereals ontogenesis and adaptation. *Fiziol. rast. genet.*, 52(1), 3–30, <https://doi.org/10.15407/frg2020.01.003> (in Ukrainian)

- Wu W., Du K., Kang X., Wei H. (2021). The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Horticulture Research*, 8, 118. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00558-3>
- Yan L., Loukoianov A., Blechl A. (2004). The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor downregulated by vernalization. *Science*, 303(5664), 1640–1644. <https://doi.org/10.1126/science.1094305>
- Yang B., Chen M., Zhan C. et al. (2022). Identification of *OsPK5* involved in rice glycolytic metabolism and GA/ABA balance for improving seed germination via genome-wide association study. *Journal of Experimental Botany*, 73(11), 3446–3461. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac071>
- Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>
- Zhao Y. (2018). Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 417–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040226>

Phytohormonal balance in leaves of the soft wheat lines isogenic for *VRN* genes

O.O. Avksentieva

The paper presents results of the study of the phytohormonal balance in mature, formed leaves of the lines of common wheat (*Triticum aestivum* L.) of the winter variety Olvia during the transition from vegetative to generative development. Near isogenic for the *VRN* genes lines (NILs) created in the gene pool of the Olvia variety and plants of the vernalized and non-vernalized winter variety were used. The experiments were carried out under the conditions of a vegetation experiment in the factorial chamber of the Department of Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms of the V.N. Karazin KhNU. During the experiment, we conducted physiological observations and analyzed the development rate of experimental plants. Phytohormone analysis was carried out in fixed plant material by a chromatographic distribution of phytohormone mixture with thin-layer chromatography. The phytohormones were identified by the reference standards irradiating the chromatograms with ultraviolet UV (254 nm), and the content was determined by biotesting methods. The level of main classes of classical growth-stimulating phytohormones (auxins (IAA), cytokinins (CK), and gibberellins (GA), and growth-inhibiting hormones (abscisins (ABA)) was analyzed. The indicators of phytohormonal balance were calculated as the ratio of growth-stimulating and growth-inhibiting hormones. The results of the experiments showed that phytohormones in mature, formed leaves of the experimental plants are represented by auxins – 64.9-70.7 µg/g, cytokinins – 26.6-30.5 µg/g, gibberellins – 179.47-228.68 µg/g, and abscisins – 54.06-89.76 µg/g of dry weight. Among the phytohormone classes studied, the minimal was the cytokinins' content, while the phytohormones of terpenoid nature (gibberellins and abscisins) were represented best. It has been established that the phytohormonal balance viz. the ratio of growth-stimulating and growth-inhibiting phytohormones reflects the development rate of experimental plants. Rapidly developing plants of isolines *VRN 1* and *VRN 3*, and the plants of vernalized variety were characterized by the maximum phytohormone balance (especially GA/ABA), while the slowly developing plants of the isolate *VRN 2* and the non-vernalized variety Olvia had the minimum balance. Since the plant organism is an integrated system of organs and functions, we assume that this indicator – phytohormonal balance in plant leaves, can be used as a marker of the ontogenetic state of the entire plant organism. The identified changes in the phytohormonal status of mature, formed leaves and the development rates of experimental plants have the same regularities in all the models used in our research: the model of isogenic lines and the model of vernalized and non-vernalized plants of the winter variety. This fact makes it possible to assume that changes in the phytohormone balance of mature leaves, which reflect the ontogenetic state of the entire plant organism, are determined by the genotypic and phenotypic (epigenetic) influence.

Key words: *Triticum aestivum* L., *VRN* genes, vernalization, phytohormonal balance, IAA, CK, GA, ABA, development rates.

Cite this article: Avksentieva O.O. Phytohormonal balance in leaves of soft wheat lines isogenic for *VRN* genes. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 2023, 40, 49–58. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2023-40-4> (in Ukrainian)

About the author:

O.O. Avksentieva – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

Received: 26.07.2022 / Revised: 05.10.2022 / Accepted: 24.05.2023